



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Revisión de estudios en identificación de biomarcadores para diagnóstico temprano de cáncer de páncreas

Autor/es

JOSUNE ANTÓN RAMÍREZ

Director/es

MARÍA TERESA TENA VÁZQUEZ DE LA TORRE y María Pilar Martínez Moral

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2019-20



Revisión de estudios en identificación de biomarcadores para diagnóstico temprano de cáncer de páncreas, de JOSUNE ANTÓN RAMÍREZ (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

Trabajo de fin de máster

Revisión de estudios en identificación de biomarcadores para diagnóstico temprano de cáncer de páncreas

Máster en Química y Biotecnología

Josune Antón Ramírez

Tutoras: María Teresa Tena Vázquez de la Torre;

María Pilar Martínez Moral



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Índice

ABREVIACIONES	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1 OBJETIVOS Y DESARROLLO	4
2 INTRODUCCIÓN	6
2.1 El cáncer de páncreas	6
2.1.1 Clasificación	6
2.1.2 Causas y factores de riesgo	7
2.1.3 Incidencia, prevalencia, mortalidad y supervivencia	7
2.2 Las ciencias ómicas	10
2.2.1 Metabolómica	10
2.2.2 Estudios metabolómicos de biomarcadores	11
2.3 GC/MS	13
2.3.1 Desarrollo y descripción	13
3 ESTUDIOS ÓMICOS EN LA DETECCIÓN DEL CÁNCER	15
3.1 Consideraciones previas	15
3.1.1 Diseño del plan experimental	15
3.1.2 Enfoque dirigido y no dirigido	15
3.1.3 Estándares de referencia	16
3.1.4 Pruebas diagnósticas	16
3.2 Biomarcadores y cáncer de páncreas	22
3.3 Volatolómica	30
3.3.1 HS-SPME-GC/MS en la identificación de biomarcadores	31
3.3.2 Matrices	32
4 CONCLUSIONES	37
5 AGRADECIMIENTOS	38
6 BIBLIOGRAFÍA	39

ABREVIACIONES

AUC	Area under the curve / Área bajo la curva	LYVE1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 / Receptor 1 de hialuronano endotelial del vaso linfático
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9 / Antígeno carbohidrato 19-9	MCI1	Macrophage inhibitory cytokine 1 / Citoquina inhibidora de macrófagos 1
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	MCN	Mucinous cystic neoplasm / Neoplasia quística mucinosa
CE/MS	Capillary electrophoresis–mass spectrometry / Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas	NMR	Nuclear magnetic resonance / Resonancia magnética nuclear
CEA	Carcinoembryonic antigen / Antígeno carcinoembrionario	PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia / Neoplasia pancreática epitelial
dCCA	Distal colangiocarcinoma / Colangiocarcinoma distal	PDAC(PC)/ADP(CP)	Pancreatic ductal adenocarcinoma (Pancreatic cancer) / Adenocarcinoma pancreático ductal (Cáncer de páncreas)
DHEA	Dehydroepiandrosterone / Dehidropiandosterona	REG1A	Islet of Langerhans regenerating protein / Proteína regeneradora de los islotes de Langerhans
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	ROC	Receiver operating characteristic / Curva de características operativas
FAIMS	Field asymmetric ion mobility spectrometry / Espectrometría de movilidad de iones de campo asimétrico	ROS	Reactive oxygen species / Especies reactivas de oxígeno
GC/MS	Gas chromatography–Mass spectrometry / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	TFF1	Trefoil factor1 / Factor trébol 1
HS-SPME	Headspace solid phase microextraction / Espacio de cabeza-microextracción en fase sólida	TFG-β	Transforming growth factor beta / Factor de crecimiento transformante beta
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm / Neoplasia mucinosa papilar intraductal	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 / Inhibidor tisular de metaloproteinasas-1
LC-HRMS	Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry / Cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución	UHPLC/MS	Ultrahigh performance liquid chromatography–mass spectrometry / Cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas
LRG1	Leucine-rich α-2-glycoprotein 1 / α-2-glucoproteína rica en leucina 1	VOCs	Volatile organic compounds / Compuestos orgánicos volátiles

RESUMEN

El empleo de métodos de análisis químico para la detección de enfermedades es un hecho en los laboratorios de diagnóstico clínico. Los diversos métodos disponibles permiten gran versatilidad a la hora de analizar diferentes matrices de variada complejidad.

El principal objetivo de la aplicación de estas técnicas en medicina se encuentra en la identificación de los componentes de una muestra (analitos) para buscar cómo se asocian con los procesos metabólicos del organismo. Gracias a esta asociación se puede discriminar a individuos sanos de enfermos mediante el uso de biomarcadores determinados empleando extracción, cromatografía, electroforesis, espectroscopía, electroquímica, etc.

Cobra especial interés el uso de estas técnicas analíticas para la detección del cáncer, referido a todas las enfermedades que se derivan del crecimiento celular descontrolado. Como cualquier otra célula de nuestro organismo, las células cancerosas generan sustancias derivadas de su metabolismo que son la diana de los estudios.

El cáncer de páncreas (PC) es, actualmente, uno de los más mortíferos debido, principalmente, a su tardía detección. Por ello el uso de técnicas analíticas como la cromatografía de gases unida a la espectrometría de masas (GC/MS) suponen una ventana para identificar biomarcadores, lo más específicos posible, para su diagnóstico precoz.

Como se menciona anteriormente, las matrices que se pueden analizar pueden ser de diversa naturaleza pudiendo provenir de fluidos corporales como sangre, suero, orina, aire exhalado o heces. Dado que esta cromatografía determina compuestos volátiles, se busca una matriz en la cual el contenido de éstos sea lo suficientemente representativo. Además, uno de los objetivos que se persigue es la facilidad a la hora de obtener la muestra de manera que sea de la forma menos invasiva posible.

La convergencia de estos puntos es el centro del análisis llevado a cabo en este trabajo, donde se expondrán algunos ejemplos y las ventajas del uso de la GC/MS para la determinación de biomarcadores en la detección temprana del cáncer de páncreas. En la actualidad los biomarcadores utilizados en detección temprana quedan restringidos al antígeno de carbohidrato 19-9 (CA19-9) y al antígeno carcinoembrionario (CEA) los cuales tienen límites en su sensibilidad y especificidad y hacen, por lo tanto, necesaria la búsqueda de nuevos compuestos.

ABSTRACT

The use of analytical chemistry methods for the detection of diseases is a fact in clinical diagnostic laboratories. The various methods into which this discipline is divided allow great versatility when analyzing different matrices of varying complexity.

The main objective of the application of these techniques in medicine is the identification of the components of a sample (analytes) to find out how they are associated with the metabolic processes of the organism. Thanks to this association, healthy individuals can be discriminated from patients by way of specific biomarkers and extraction, chromatography, electrophoresis, spectroscopy, electrochemistry, etc.

Of special interest is the use of these analytical techniques for the detection of cancer, referring to all the diseases that derive from uncontrolled cell growth. Like any other cell in our body, cancer cells produce chemicals from their metabolism that are the target of studies.

Pancreatic cancer (PC) is currently one of the deadliest diseases, mainly due to its late detection. The use of analytical techniques such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) represent a window to identify biomarkers, as specific as possible, for their early diagnosis.

As mentioned above, the matrices analyzed can be of diverse nature and can come from body fluids such as blood, serum, urine, exhaled air or feces. The target of the technique are volatile compounds, because of that the matrices wanted must contain the largest number of this compounds. Furthermore, one of the objectives pursued is the ease of obtaining the sample in a way that is as less invasive as possible.

The convergence of these points is the center of analysis carried out in this work, where the advantages of the use of GC / MS for the determination of biomarkers in the early detection of cancer will be exposed. Currently, the biomarkers used in early detection are restricted to carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA), which have limits in their sensitivity and specificity and, therefore, require the search of new compounds.

1 OBJETIVOS Y DESARROLLO

El objetivo de este trabajo es analizar las últimas investigaciones relacionadas con la búsqueda de metabolitos que puedan utilizarse como biomarcadores para la detección temprana del cáncer de páncreas e identificar aquellos estudios que ofrezcan un conjunto de metabolitos capaces de discriminar entre pacientes enfermos e individuos sanos.

Asimismo, se tratará de establecer la relación entre los metabolitos hallados y las rutas metabólicas que los generan permitiendo asociarlos con órganos que presentan irregularidades en su desarrollo y por tanto enfermedad.

Los criterios seguidos para su desarrollo han sido la selección de artículos relacionados con la búsqueda de biomarcadores para la detección temprana del cáncer de páncreas haciendo uso de diferentes plataformas analíticas, pero centrado en cromatografía de gases, y usando diferentes matrices.

Para la búsqueda se han empleado bases de datos como PubMed o Scopus introduciendo como palabras clave: páncreas, cáncer, biomarcador, cromatografía de gases. También se incluyen estudios de otros tipos de cáncer, que usan la misma metodología, con la finalidad de poder comparar resultados, ya que ciertos metabolitos se encuentran en rutas metabólicas comunes a distintos cánceres lo que sirve para discriminarlos para su uso como biomarcadores de cáncer de páncreas (Figura 1).

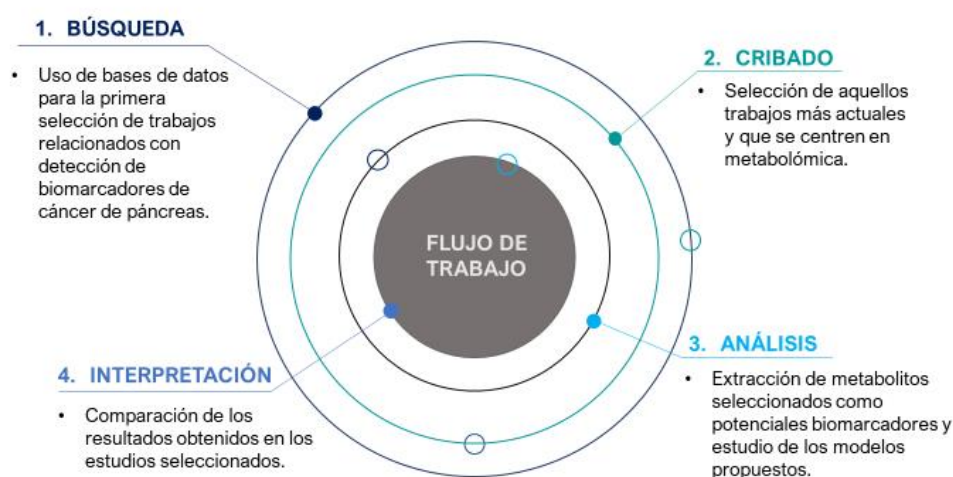


Figura 1. Esquema resumen del flujo de trabajo seguido en la realización del análisis.

Se ha seleccionado un rango de diez años para las publicaciones analizadas destacando un total de 22 estudios sobre los cuales se realiza la discusión de resultados.

Dentro del total de estos estudios se ha realizado la selección de aquellos que han identificado metabolitos como posibles biomarcadores de cáncer de páncreas y que se han usado para elaborar modelos diagnósticos, destacando los que usan como plataforma principal la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Mediante esta plataforma se consigue la identificación de compuestos orgánicos volátiles, los cuales se obtienen mediante muestras de diferentes matrices, remarcando la orina sobre las demás por su fácil obtención y que la hace especialmente interesante.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 El cáncer de páncreas

El páncreas se compone de una componente exocrina, donde se producen proteínas que ayudan al organismo a digerir y descomponer alimentos, y de una componente endocrina, formada por células que producen hormonas específicas siendo la más importante la insulina. La función del páncreas nos da, ya tempranamente, una idea de la cantidad de compuestos que generan los procesos metabólicos llevados en él.

Por definición el cáncer de páncreas es la enfermedad originada del crecimiento anómalo de las células que forman parte de este órgano ¹.

La complejidad en el diagnóstico de este tipo de cáncer proviene de su localización en el organismo pues, dada su situación, no es sencillo realizar una palpación o una visualización directa del órgano para poder determinar una anomalía en su desarrollo.

2.1.1 Clasificación

En función de la/s zona/as de afección de la enfermedad se pueden determinar tres puntos de desarrollo:

- Local: se produce la obstrucción de los conductos secretores
- Diseminación linfática: a través de los vasos linfáticos, afecta a los ganglios próximos y posteriormente a los más alejados.
- Diseminación heterogénea: a través de los vasos sanguíneos preferentemente hacia el hígado.

El sistema de clasificación es el denominado TNM atendiendo a T: tamaño, N: afección a los ganglios linfáticos y M: afección o no a otros órganos.

T1	≤ 2 cm
T2	4- 2cm
T3	>4 cm
T4	No extirpable
N0	Ausencia de ganglios linfáticos infiltrados por el tumor
N1	Presencia de infiltración tumoral en los ganglios linfáticos
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

En función a este sistema el cáncer se organiza en diferentes fases:

Tabla 1. Clasificación por estadio del cáncer de páncreas. (Modificado de Syl y Young ²)

Estadio	Tamaño	Infiltración tumoral	Metástasis a distancia
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2 o T3	N1	M0
III	T4	N0 o N1	M0
IV	T1, T2, T3 o T4	N0 o N1	M1

2.1.2 Causas y factores de riesgo

El conocimiento de los factores de riesgo que originan el cáncer de páncreas es fundamental para ayudar a la detección temprana y establecer unos rangos de población sobre los cuales el cáncer es más incidente (Figura 2).

FACTORES DE RIESGO EN CÁNCER DE PÁNCREAS	
<u>Hereditarios</u>	<u>No hereditarios</u>
<ul style="list-style-type: none">• Antecedentes familiares• Síndromes hereditarios<ul style="list-style-type: none">– Peutz-Jeghers– Li Fraumeni– Lynch• Polimorfismos genéticos	<ul style="list-style-type: none">• Medioambientales<ul style="list-style-type: none">– Tabaquismo– Exposiciones laborales– Energéticos, dieta, actividad física• Patologías médicas<ul style="list-style-type: none">– Diabetes– Pancreatitis– Infecciones• Hormonales

Figura 2. Clasificación de los factores de riesgo para el cáncer de páncreas en función de su origen.

Al igual que ocurre con otro tipo de enfermedades podemos encontrarnos con factores de tipo hereditario y factores ambientales.

Dentro de estos dos grandes grupos los factores más relevantes son aquellos hereditarios como el síndrome de Peutz-Jeghers o la pancreatitis hereditaria. Además son de especial importancia factores como la edad o el tabaquismo ³.

2.1.3 Incidencia, prevalencia, mortalidad y supervivencia

La incidencia se refiere al número de nuevos casos en una población y en un tiempo determinados. Suele representarse como el número absoluto de nuevos casos o como el número de casos nuevos por 100.000 personas en un año.

La estimación para ambos sexos del cáncer de páncreas en España para el 2020 es de 8338 nuevos casos según los datos de la Red Española de Registro de Cáncer (REDECAM). Esta tendencia sigue en aumento aunque hay que tener en cuenta el incremento de la población además de su envejecimiento, puesto que la edad es uno de los factores más condicionantes en el desarrollo de la enfermedad⁴.

Los datos recogidos del Instituto Nacional de Estadística relativos a las muertes debidas a tumores supusieron un 26,4% en 2018 siendo la segunda causa de muerte por detrás de las enfermedades circulatorias (28,3%). En comparación con las cifras del año anterior se ha observado una disminución de un 1.3% de fallecidos ⁵.

El cáncer de páncreas se encontró el tercero en defunciones en el año 2018 con 7120 fallecidos, viéndose superado por el cáncer de pulmón y colorrectal y superando al cáncer de mama y próstata. Destaca que con respecto al año anterior se ha producido un aumento de la mortalidad de un 3,7% (Figura 3).

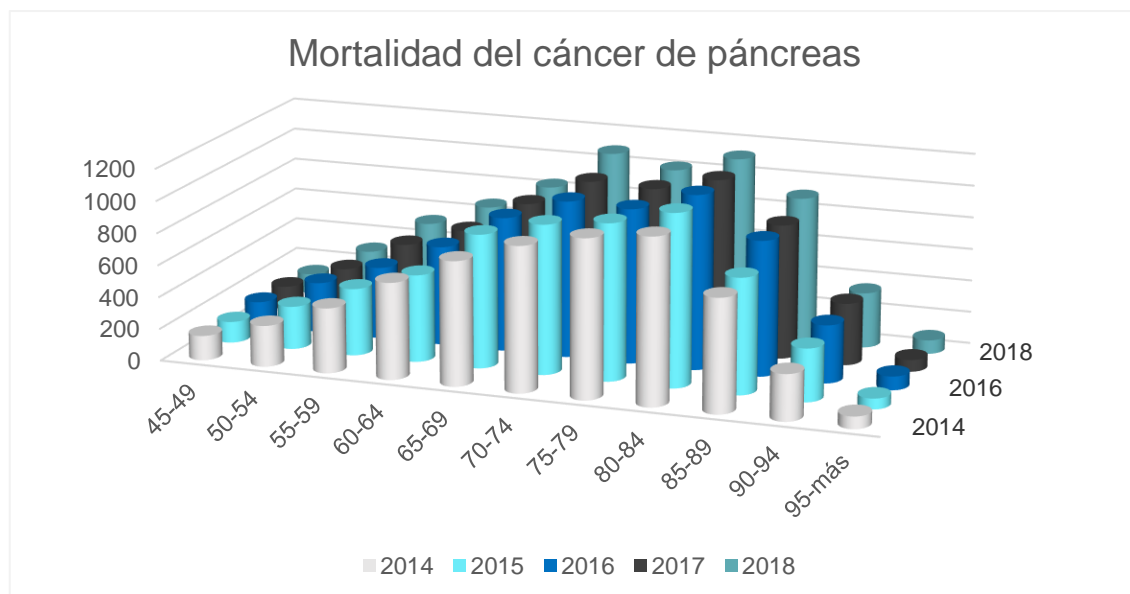


Figura 3. Mortalidad en España relacionada con cáncer de páncreas a lo largo de 5 años. Fuente Instituto Nacional de Estadística (INE), relativo a los datos recogidos hasta 2018.

Si junto a esto comparamos los datos de supervivencia neta, la cual nos indica la probabilidad de sobrevivir tras cinco años desde el diagnóstico, observamos que el cáncer de páncreas tiene las cifras más bajas con respecto a los otros tipos de cáncer que se encuentran por encima de él ⁶, con tan sólo un 10% para mujeres (Figura 4) y un 7.2% para hombres (Figura 5).

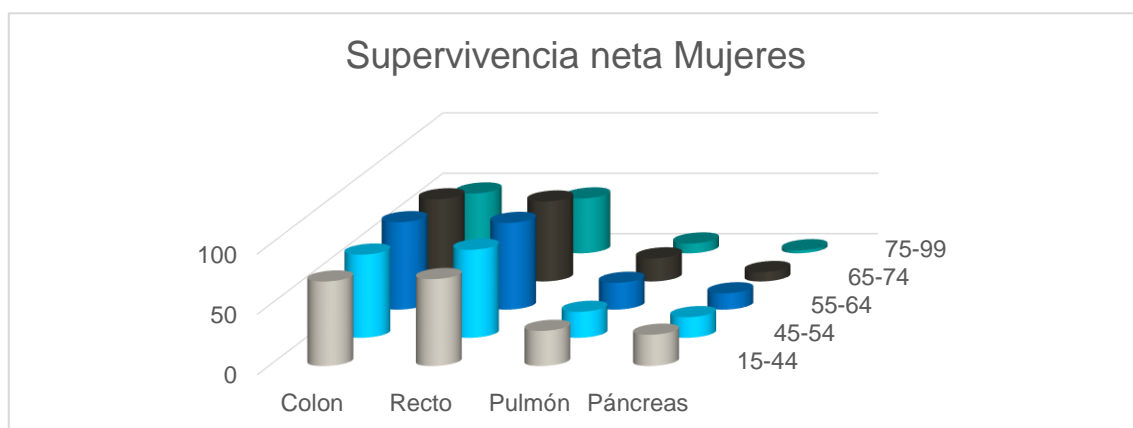


Figura 4. Supervivencia neta en mujeres para los principales cánceres y rango de edades en España durante 2018. Obtenido a partir de datos recogidos del INE.

A tenor de los datos anteriores la prevalencia del cáncer de páncreas es más baja que en el resto de tumores, dado que se encuentra definida por la supervivencia, siendo la proporción de población sujeta a la enfermedad en un momento determinado. Así, tumores con alta supervivencia tendrán mayor prevalencia.

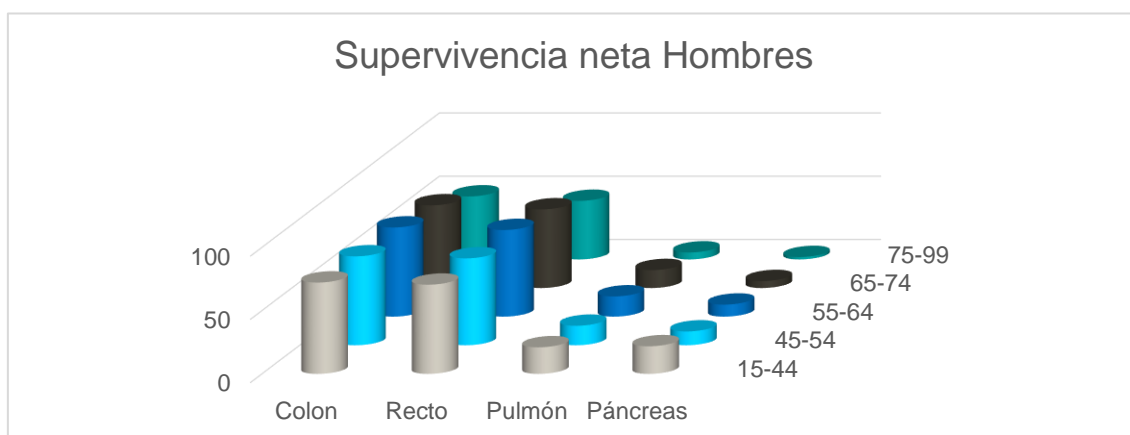


Figura 5. Supervivencia neta en hombres para los principales cánceres y rango de edades en España durante 2018. Obtenido a partir de datos recogidos del INE.

2.2 Las ciencias ómicas

Las ciencias ómicas son el campo de estudio de las ciencias biológicas referido a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.

El objetivo de estas ciencias en su conjunto es el de describir las funciones, estructura, organización y estado de un organismo a través del estudio de sus componentes básicos desde distintos niveles de complejidad ⁷(Figura 6).

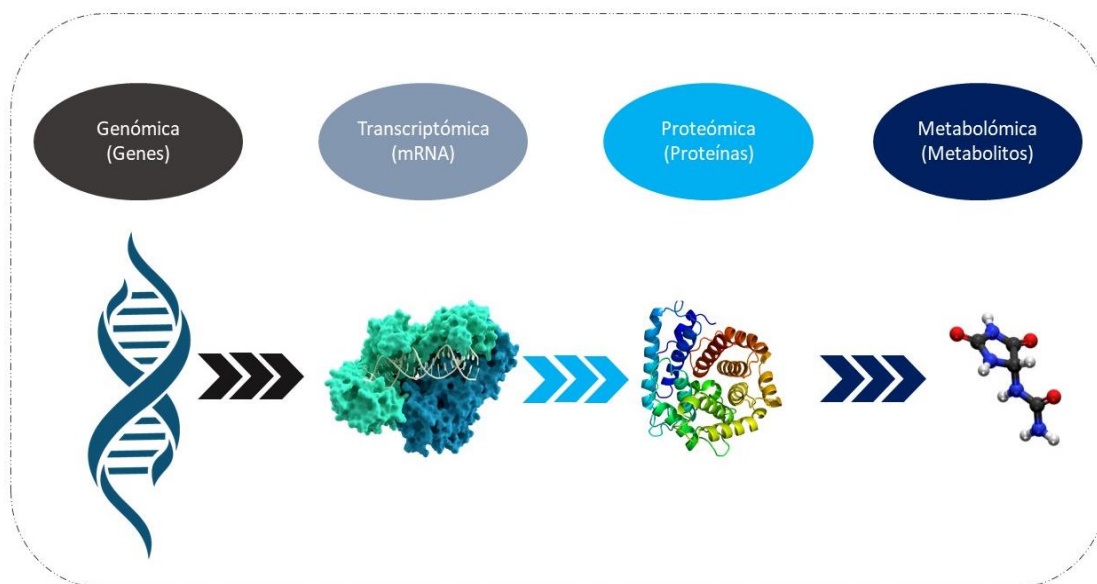


Figura 6. Cascada ómica. A medida que descendemos en la cascada nos acercamos más al fenotipo.

Las bases de datos como la del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST por sus siglas en inglés) que contiene un registro de más de 72.000 compuestos⁸, o PubChem, con más de 103.000.000⁹ o ChemSpider con acceso a 67M¹⁰, constituyen una herramienta imprescindible que sirve para la identificación fiable de metabolitos, consiguiendo relacionarlos con las rutas metabólicas de origen y por tanto con una patología determinada.

2.2.1 Metabolómica

Como se deduce de la descripción de las ciencias ómicas, la metabolómica es el eslabón de la cadena que se relaciona directamente con el fenotipo y la que, por lo tanto, nos da la información del estado de un organismo.

A diferencia de la genómica y la proteómica, las cuales se basan en la regulación genética y postraduccion, la metabolómica es el marcador directo de la actividad bioquímica indicando la influencia en el fenotipo ¹¹.

El origen de los metabolitos es muy heterogéneo encontrando metabolitos exógenos, aquellos que provienen de los hábitos de consumo, y endógenos, donde se engloban todos los cuales genera el propio organismo. De igual manera hay rutas metabólicas en las cuales participan el mismo tipo de metabolitos lo que dificulta la tarea de correlación entre ambos elementos.

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes plataformas para la identificación de metabolitos (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de las principales plataformas analíticas utilizadas en la detección de metabolitos.

Técnicas de identificación	Fundamento	Aplicaciones
GC/MS	Separa los componentes de una muestra con diferente afinidad por una fase estacionaria situada en la columna cromatográfica.	Detección de compuestos volátiles
LC/MS	Separa los componentes de una mezcla utilizando como fase móvil un líquido.	Separación de moléculas orgánicas o inorgánicas con peso molecular alto.
CE/MS	Separación de moléculas mediante la aplicación de un campo eléctrico que provoca el movimiento diferencial de las especies cargadas, las cuales se diferencian al desplazarse por un capilar.	Separación de proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos.
NMR	Obtiene información estructural mediante la aplicación de radiofrecuencias que excitan los diferentes núcleos atómicos presentes en la muestra.	Elucidación estructural de compuestos orgánicos.
MALDI – TOF	Espectrometría de masas donde los analitos se encuentran en una matriz que es irradiada con UV provocando la ionización del analito.	Análisis de proteínas

2.2.2 Estudios metabolómicos de biomarcadores

Son muchos los esfuerzos que se realizan para la detección de enfermedades, especialmente la detección temprana del cáncer, y el creciente desarrollo de las ciencias ómicas ha permitido descubrir una gran cantidad de metabolitos que son capaces de discriminar entre pacientes enfermos e individuos sanos.

Las primeras aproximaciones se encuentran en el campo de la genómica, transcriptómica y proteómica obteniendo importantes marcadores del cáncer de páncreas como son los genes KRAS, TP53, SMAD4, CDKN2A entre otros ¹².

Aun siendo enorme el aporte conseguido hasta ahora, estas ciencias limitan sus observaciones a los genes, quedando fuera de su campo factores que son claramente influyentes en el desarrollo del cáncer. Se ha demostrado que los

hábitos alimenticios y de conducta de los individuos son determinantes y suponen claros factores de riesgo ¹³.

Es por esto que la metabolómica supone un paso más en el estudio del desarrollo del cáncer y su proximidad al fenotipo aporta información complementaria que ayuda a la tarea de la detección temprana.

2.3 GC/MS

La cromatografía de gases se trata de una técnica analítica que implica volatilizar los analitos contenidos en la muestra que posteriormente se introduce en una columna donde se separan sus componentes. Esta descripción la convierte en la plataforma idónea para la detección de compuestos orgánicos volátiles. Aco- plado a este cromatógrafo se encuentra un espectrómetro de masas que ioniza y fragmenta los componentes y los identifica por su diferente relación masa/carga (m/z). Para esto los componentes de la muestra deben poder volatilizarse sin descomponerse lo cual se consigue controlando la temperatura de inyección.

Aún con ciertas limitaciones, es alta la cantidad de analitos que pueden obte- nerse mediante esta técnica.

Se trata de una técnica muy estandarizada en el estudio de metabolitos con pro- tocolos establecidos para detección de aminoácidos, hormonas, ácidos grasos, intermediarios del metabolismo primario, etc., con una gran sensibilidad y buena reproducibilidad.

2.3.1 Desarrollo y descripción

Los compuestos volátiles de la muestra se obtienen mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), técnica desarrollada a principios de los 90 que resulta muy sencilla para la obtención de los analitos.

El fundamento de la SPME se basa en la adsorción de los analitos a una fibra cubierta con la fase de extracción, las cuales son de diferentes composiciones atendiendo a la naturaleza de los analitos que queramos extraer.

La fibra se introduce en el vial con la muestra, bien sumergiéndola en esta o bien colocándola en el espacio superior sobre ella, espacio de cabeza (HS, por sus siglas en inglés) (Figura 7).

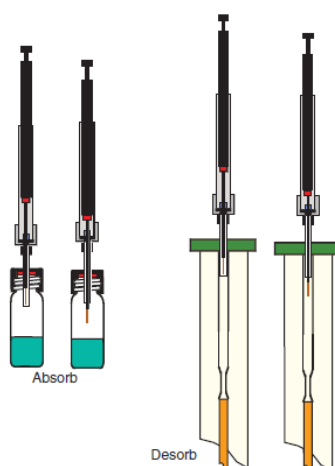


Figura 7. Detalle de la adsorción de analitos a la fibra mediante la técnica de extracción del espacio de cabeza. La fibra queda expuesta en el espacio de cabeza del vial y los analitos quedan adsorbidos (Izquierda). La fibra se inyecta en la entrada, donde permanece expuesta hasta que se desorben los analitos que pasarán a la columna para su separación (Derecha).¹⁴

En el muestreo de cabeza estático, la muestra se encuentra en equilibrio termodinámico con la fase gaseosa en un recipiente termostatzado cerrado. Los analitos adsorbidos son volátiles lo que hace de la extracción mediante espacio de cabeza ideal para muestras sucias y complejas como, sangre, orina, suero, tejidos, etc. Sólo la porción volátil de la muestra está en el espacio superior.

Esta técnica se trata de una de las más utilizadas para la identificación de metabolitos como posibles biomarcadores.

3 ESTUDIOS ÓMICOS EN LA DETECCIÓN DEL CÁNCER

3.1 Consideraciones previas

Con el fin de hacer un correcto seguimiento del análisis conviene aclarar conceptos que se manejarán a lo largo del estudio. La terminología utilizada, los mecanismos usados en el tratamiento de datos y la interpretación de éstos son puntos importantes que afectan al resultado y han de ser tenidos en cuenta.

3.1.1 *Diseño del plan experimental*

Dado que el objetivo en toda investigación que pretende encontrar biomarcadores de enfermedades relacionadas con el hombre es el uso con fines clínicos, el plan experimental ha de ser suficientemente consistente. El diseño propuesto por Wettersten y Weiss¹⁵ de tres pasos (Figura 8): 1.Descubrimiento, 2.Pre-validación y cuantificación, y 3.Validación y aplicación, consigue implementar una metodología a seguir para determinar los metabolitos más adecuados entre los encontrados.

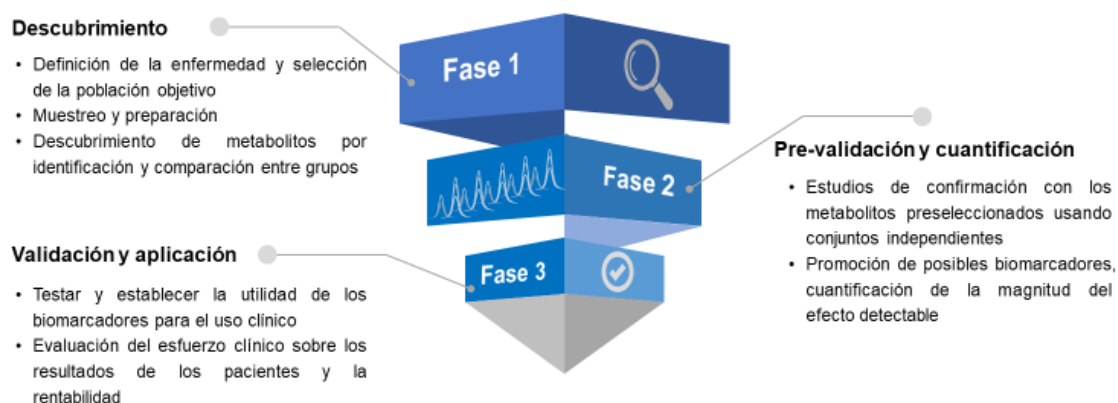


Figura 8. Diseño en tres fases en el descubrimiento de biomarcadores (Modificado de Wettersten y Weiss).

No es sencillo encontrar un único biomarcador que sea capaz de distinguir dos grupos diferentes con una fiabilidad clara por lo que es más común el uso de un conjunto de ellos que sean capaces de determinar con mayor precisión la ausencia o presencia de enfermedad.

3.1.2 *Enfoque dirigido y no dirigido*

Se pueden tomar dos enfoques de investigación de los metabolitos, pudiendo ser investigación dirigida o no dirigida.

El análisis dirigido implica examinar una serie de metabolitos seleccionados previamente y compararlos frente a unos estándares, con lo cual obtenemos información cualitativa y cuantitativa con alta confianza.

El análisis no dirigido, por el contrario, implica la obtención del mayor número de metabolitos contenidos en una muestra permitiendo el descubrimiento de biomarcadores, así como realizar estudios comparativos de variabilidad de metabolitos dentro de grupos¹¹.

Se puede así llevar a cabo experimentos como la realización de un perfil o huellas metabolómicas. La huella metabolómica nos lleva a identificar metabolitos expresados diferencialmente y que definen clases dentro la muestra. Por su parte el perfil metabolómico nos lleva a asociar un grupo específico e integrarlo en su ruta correspondiente consiguiendo una mejor comprensión biológica de esta ¹⁶.

3.1.3 Estándares de referencia

Debido a los problemas que supone la correcta identificación de analitos que se puedan relacionar con el cáncer de páncreas es de gran interés el poder contar con estándares de referencia.

Se tratan de sustancias de alto nivel de pureza y perfectamente caracterizadas que son usadas para hacer una identificación de los analitos y determinar su concentración¹⁷.

3.1.4 Pruebas diagnósticas

Estas pruebas son las que estrictamente nos definen si un paciente presenta una patología o no.

Los términos en los que se describen los modelos suelen ser la sensibilidad y la especificidad. La prueba de la curva ROC (curva de características operativas) permite distinguir la fiabilidad del estudio en base a estos términos, así como otros como el valor predictivo positivo o valor predictivo negativo, y resuelve la verosimilitud del modelo para distinguir entre pacientes enfermos e individuos sanos.

Una prueba será sensible cuando sea capaz de identificar los individuos enfermos, asimismo será específica cuando sea capaz de identificar individuos no enfermos. Dichos valores se interrelacionan de forma inversa, es decir, el aumento de uno hace que disminuya el otro y viceversa. Las pruebas son aplicables a valores continuos por lo tanto necesitan de la determinación de un valor umbral (cutt off) que nos representa cuando un resultado empieza a ser tomado como positivo. Hay que seleccionar de forma correcta este valor umbral para evitar errores de baja sensibilidad, los cuales ocurren cuando se asignan valores altos ¹⁸.

Las curvas ROC son la representación gráfica de enfrentar la sensibilidad frente a 1- especificidad. El área que se encuentra bajo la curva (AUC) será indicativo del mayor poder discriminatorio entre los casos positivos de aquellos que no lo

son. El rango de valores del área bajo la curva se encuentra entre 0.5 y 1, siendo considerada una buena prueba aquella con valores de 0.8 o superiores ¹⁹.

Los valores predictivos, indican la probabilidad de que un paciente con un resultado positivo esté enfermo (valor predictivo positivo) o que un paciente con resultado negativo no esté enfermo (valor predictivo negativo) respectivamente.

Finalmente, la razón de verosimilitud (likelihood Ratio) se trata de un indicador de la probabilidad de tener o no la enfermedad estudiada. Valora cómo de exacta es una prueba clínica. Las pruebas diagnósticas constan de dos razones de verosimilitud, la razón positiva y la negativa. La primera se calcula mediante el cociente entre la sensibilidad y 1-especificidad; la segunda se obtiene mediante el cociente entre 1-sensibilidad y la especificidad ²⁰.

Implementar las pruebas diagnósticas con biomarcadores es sumamente importante. Nos dan la relación entre las moléculas propuestas y la capacidad de estas para discriminar, no sólo entre individuos sanos y enfermos, sino también entre diferentes enfermedades y entre diferentes estadios de enfermedad.

Las ciencias ómicas pueden emplearse en la detección y seguimiento de una gran variedad de enfermedades. En la tabla 3 se presentan los estudios analizados en el presente trabajo donde se utilizan diferentes plataformas analíticas en la identificación de metabolitos como posibles biomarcadores para la detección de cáncer.

Tabla 3. Relación de estudios metabolómicos tratados para la identificación de biomarcadores indicadores de cáncer.

Plataforma analítica	Matriz	Órgano	Autores publicación (año)	Objetivo
LC-HRMS	Suero	Páncreas	Martín-Blazquez A. et.al ²¹ (2020)	Identificación tentativa de biomarcadores mediante metabolómica no dirigida
UHPLC/MS	Suero	Páncreas	Macias, R. et.al ²² (2020)	Diferenciación entre PDAC y dCCA
FAIMS	Orina	Páncreas	Samuli I. et.al ²³ (2019)	Evaluar la capacidad de discriminación entre pacientes sanos, con lesiones previas malignas y enfermos.
GC/MS	Suero	Páncreas	Hontañón A. et.al ²⁴ (2019)	Búsqueda de biomarcadores no dirigida
NMR	Suero	Páncreas	Fest J., et.al ²⁵ (2019)	Identificar y validar biomarcadores metabólicos plasmáticos encontrados previamente asociados con las primeras etapas del cáncer de páncreas.
GC/MS-QTOF	Orina	Mama	Mark Woollam et.al ²⁶ (2018)	Determinación de biomarcadores del cáncer de mama en orina de ratones.

Tabla 3. (Continuación)

Plataforma analítica	Matriz	Órgano	Autores publicación (año)	Objetivo
GC/MS	Aire	Páncreas	Markar S.R. et.al ²⁷ (2018)	Diferenciación entre pacientes con PC e individuos sanos analizando metabolitos obtenidos por aire exhalado
GC/MS/MS	Plasma	Páncreas	Takashi N. et.al ²⁸ (2017)	Discriminación entre metaboloma de pacientes con cáncer de sanos.
GC/MS/MS	Plasma/ Suero	Páncreas	Hirata Y. et.al ²⁹ (2017)	Detección de biomarcadores en dos grupos comparativos.
GC/MS	Orina	Riñón	Márcia Monteiro et.al ³⁰ (2017)	Determinación de biomarcadores comparando pacientes sanos y enfermos.
GC/MS- LC/MS	Suero	Páncreas	Arata S. et.al ³¹ (2016)	Desarrollar un modelo de diagnóstico mediante un sistema multiplataforma de metabolitos en suero en dos fases. GC/MS y LC/MS.
NMR	Suero	Páncreas	Xianchao L. et.al ³² (2016)	Determinar los mecanismos bioquímicos de la neoplasia intraepitelial (PanIN) y el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y determinar biomarcadores de detección temprana

Tabla 3. (Continuación)

Plataforma analítica	Matriz	Órgano	Autores publicación (año)	Objetivo
LC/MS/MS	Plasma	Páncreas	Capello, M. et al. ³³ (2016)	Biomarcadores obtenidos en un estudio anterior son sometidos a un ensayo ELISA para su valoración.
GeLC/MS/MS	Orina	Páncreas	Radon T. et.al ³⁴ (2015)	Identificar 3 biomarcadores y validarlos mediante ELISA
LC/TOFMS-GC/TOFMS	Plasma	Páncreas	Guoxiang X. et.al ³⁵ (2014)	Construcción de un modelo de diagnóstico de PC con dos grupos geográficos diferenciados de pacientes enfermos e individuos sanos.
GC/MS	Orina	Riñón	Márcia Monteiro et.al ³⁶ (2014)	Discriminación de pacientes con cáncer y sanos. Optimización de la metodología.
GC/MS	Suero	Páncreas	Kobayashi T. et.al ³⁷ (2013)	Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método usando grupos de pacientes enfermos e individuos sanos.
NMR	Orina	Páncreas	Davis, Vanessa W. et.al. ³⁸ (2013)	Análisis discriminatorio de los espectros obtenidos entre individuos sanos y pacientes enfermos.

Tabla 3. (Continuación)

Plataforma analítica	Matriz	Órgano	Autores publicación (año)	Objetivo
SPME-GC/MS	Orina	Mama	Catarina L. Silva et.al ³⁹ (2012)	Optimización de parámetros de medida y determinación por diferenciación de biomarcadores entre pacientes con cáncer e individuos sanos.
SPME-GC/MS	Orina	Varios	Catarina L. Silva et.al ⁴⁰ (2011)	Investigación de biomarcadores como diferenciación de individuos sanos e individuos con distintos tipos de cáncer. Optimización del método de extracción.
NMR	Orina	Páncreas	Napoli, C. et.al ⁴¹ (2011)	Diferenciación de metabolitos de pacientes con PC e individuos sanos
GC/MS	Suero	Páncreas	Nishiumi, S. et. Al ⁴² (2010)	Evaluación d los metabolitos encontrados en pacientes con diferentes estadios del cáncer e individuos sanos.

3.2 Biomarcadores y cáncer de páncreas

En el campo de la proteómica ha cobrado interés el estudio de glicoproteínas. Se han encontrado asociaciones entre distintas enfermedades y estas glicoproteínas debido a la presencia de patrones anómalos en la glicosilación ⁴³. Los glicanos sufren cambios durante las distintas fases del cáncer los cuales incluyen sialilación, fucosilación incremento de las ramificaciones de N-acetilglucosamina y sobreexpresión de O-glicanos.

Actualmente el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) destaca como biomarcador, aunque estudios como el realizado por Kim J.E y colaboradores⁴⁴ consideran que no es lo suficientemente eficiente. No sólo se trata de un marcador para el cáncer de páncreas, sino que también se encuentran niveles elevados en otras enfermedades como la colestasis, lo que no le confiere especificidad. Además aquellos pacientes que son negativos para el antígeno de Lewis no generan esta proteína y por lo tanto no tiene validez en este grupo, el cual representa un 10% de los pacientes con cáncer⁴⁵.

Este se ha evaluado junto con otros biomarcadores proteicos como la citoquina inhibidora de macrófagos 1 (MCI-1) o las proteínas de factor de crecimiento tumoral β (TGF β)⁴⁵. En condiciones normales las proteínas del factor de crecimiento tumoral participan de la diferenciación celular, la apoptosis y mantiene la homeostasis celular, impidiendo la proliferación de tumores. Pero en células cancerosas se anula esta función y provocan la reprogramación para usarlas en la transformación y expansión celular ⁴⁶.

Aquellos metabolitos que presentan variación en sus niveles lo suficientemente significativos serán los que se usen para la realización de modelos diagnósticos. En la tabla 4 se muestra un listado de los metabolitos que han presentado variaciones, bien por aumento o bien por disminución, de sus niveles en los estudios analizados en el presente trabajo.

Tabla 4. Relación de compuestos identificados en los estudios analizados. Se encuentran tanto metabolitos, como proteínas y lípidos representando así varios puntos de la cascada ómica.

Metabolitos	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
1,2,4-trimetilbenceno	[24,39,40]	Benceno	Xileno	7247
1,5-AG	[28,29,31,35,37]	Aminoácidos	Carbohidrato	64960
1-metiltiopropano	[27]	Metionina	Dialquil tioéter	19754
2- oxopropanal	[30]	Colina	Carbohidrato	880
2,2,5,5-tetrametilte-trahidrofurano	[30]		Compuesto heterocíclico	27010
2,4 dimetilhexano	[24]		Alcano	11511

Tabla 4. (Continuación)

Metabolitos	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
2,5,8-Trimetil-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol	[30]			255178
2,6 dimetilhepta-2,4-dieno	[26]			56999211
2,6,6 trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona	[26]	Glucólisis	Ciclohexenona	62374
2,7-dimetil-quinolina	[40]			7138
2-fenilacetamida	[41]	Degradación xenobióticos	Amida de ácido monocarboxílico	7680
2-metil-3-fenil-2-propenal	[40]		Cinamaldehído	5354896
2-metoxitiofeno	[39,40]	Metionina	Compuesto sulfurado	85610
3-heptanona	[39,40]	Cuerpos cetónicos	Cetona	7802
3-hidroxibutirato	[32]	Cuerpos cetónicos	Cinamaldehído	441
4-etenil-1,2-dimetil-benceno	[26]	Degradación de xenobióticos	Estireno	33937
4-oxo-ácido retinoico	[21]	Pentosas fosfato	Lípido	6437063
Acetoína	[27]	Metabolismo de aminoácidos	Acilóide	179
Acetona	[27,32,38]	Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos	Disolvente orgánico	180
Ácido 3- hidroxiisovalérico	[41]	Degradación de leucina	Hidroxiácido graso	69362
Ácido 3- oxooctadecanoico	[21]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	5283005
Ácido 7-sulfato glicoquenodesoxicólico	[21]	Derivado ácido cólico	Acil glicina	11954205
Ácido adrenico	[21]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	5497181
Ácido aspártico	[22]	Metabolismo aspartato	Aminoácido	5960
Ácido decanoico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena media	2969
Ácido esteárico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	5281
Ácido glicérico	[42]	Pentosas fosfato	Derivado de azúcar	439194
Ácido glicocólico	[21,35]	Síntesis de ácidos biliares	Acil glicina	23617285

Tabla 4. (Continuación)

Metabolito	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
Ácido glutámico	[22]	Glutamina y glutamato	Aminoácido	33032
Ácido láctico	[42]	Glucólisis	α -hidroxiácido	61503
Ácido laurico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena media	3893
Ácido margárico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	10465
Ácido mirístico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	11005
Ácido octanoico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena media	279
Ácido palmítico	[42]	Degradación ácidos grasos	Ácido graso de cadena larga	985
Ácido tiodiglicólico	[42]	Degradación ácidos grasos	Derivado de ácido graso	3127
Ácido úrico	[28,42]	Metabolismo de la purina	Xantina	1175
Acilcarnitina	[22]	Metabolismo metionina	Compuesto de sulfonio	34756
Alcohol isopropílico	[27]	Cuerpos cetónicos	Isómero del propanol	3776
Anisol	[40]	Metabolismo de xenobióticos	Fenol éter	7519
Arabinosa	[28]	Metabolismo de carbohidratos	Pentosa	439195
Asparagina	[28,32,42]	Síntesis de proteínas	β -aminoácido	6267
Benzaldehído	[26,27]	Degradación de xenobióticos	Aldehído aromático	240
Betaina	[35]	Metabolismo serina y treonina	Aminoácido	247
CA 19-9 (Antígeno carbohidrato 19-9)	[21-42]		Proteína	643993
Cer(d18:1/24:0)	[22]	Metabolismo de lípidos	Esfingolípido	5283571
Citidina	[32]	Metabolismo de nucleótidos	Pirimidina	6175
Citrato	[32,41]	Ciclo de ácidos tricarboxílicos	Ácido carboxílico	311
Colina	[35,38]	Fosfolípidos	Lípido	305
Creatina	[32]	Metabolismo arginina y prolina	α -aminoácido	586

Tabla 4. (Continuación)

Metabolito	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
Creatinina	[32,34,41]	Metabolismo arginina y prolina	Derivado de α -aminoácido	588
Decaprenil difosfato	[21]	Síntesis de ubiquinonas y terpenoides	Politerpenoide	5462210
Deoxiguanosina	[32]	Síntesis de nucleótidos	Nucleósido	135398592
DHEA-S	[21,30]	Hormonas esteroideas	Esteroides	72986290
Dimetil disulfuro	[39,40]		Dialquil disulfuro	12232
D-limonene	[26]	Síntesis de terpenoides	Monoterpeno	439250
Fenilalanilfenilalanina	[21]		Aminoácido	65104
Fenilalanina	[32]	Metabolismo aminoácidos	Aminoácido	6140
Fenol	[39]	Fenilalanina y tirosina	Compuesto fenólico	996
Formaldehído	[27]		Aldehído	712
Fosfocolina	[32]	Metabolismo de lípidos	Compuesto precursor de fosfatidilcolina	1014
Glicerofosforilcolina	[32]	Metabolismo de lípidos	Derivado de colina	71920
Glicerol	[32]	Metabolismo de lípidos	Triglicérido	753
Glicina	[32,41,42]	Glicina, serina y treonina	Aminoácido	750
Glutamato	[32,35]		Aminoácido	611
Glutamina	[25,28,32]	Alanina, aspartato y glutamato	Aminoácido	5961
Heptanal	[40]		Aldehído de cadena media	8130
Hexanal	[40]		Alquil aldehído	6184
Hipoxantina	[38]	Metabolismo de adenosina	Purina	135398638
Hipurato	[41]		Acil glicina	464
Histidina	[25,28,29,37]	Histidina	Aminoácido	6274
Inositol	[28,29,37]	Carbohidratos	Carbohidrato	892
Isobutirato	[32]	Degradación compuestos aromáticos	Ácido graso de cadena corta	6590
Isoleucina	[32]	Aminoácidos de cadena ramificada	Aminoácido	6306
Lactato	[32]	Glucólisis anaerobia	Ácido orgánico	61503

Tabla 4. (Continuación)

Metabolito	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
Leucina	[32]	Aminoácidos de cadena ramificada	Aminoácido	6106
Lisina	[28,32]	Metabolismo de aminoácidos	Aminoácido	5962
LisoPC(18:2)	[21]	Fosfolípidos	Liso-fosfatidiletanolamina	11005824
LisoPE(18:2)	[21]	Fosfolípidos	Liso-fosfatidiletanolamina	53480926
LPC (18:0)	[31]	Fosfolípidos	Monoglicero fosfolípido	24779491
LRG1 (α -2- glico-proteína rica en leucina)	[33]		Proteína	160755483
LYVE1 (receptor hialuronano endotelial 1)	[34]		Proteína	160729450
Manosa	[31]	Glucólisis	Carbohidrato	18950
Menadiona	[26]	Metabolismo de vitaminas	Vitamina liposoluble	4055
Metanoato de butilo	[24]			11614
Metilguanidina	[17]	Degradación de proteínas	Compuesto acíclico alifático	10111
Metilmalonato	[32]	Metabolismo de aminoácidos	Derivado del ácido malónico	487
Metionina	[28]		Aminoácido	6137
N,N-Dimetilglicina	[32]		Derivado de aminoácido	673
N-Acetil tirosina	[32,42]	Tirosina	Derivado de tirosina	68310
n-Hexano	[27]	Degradación de xenobióticos	Alcano	8058
O-acetilcarnitina	[38]	Oxidación ácidos grasos	Éster ácido acético	7045767
Octanol	[40]		Alcohol primario	957
Oleoil L-carnitina	[21]		Acil carnitina de cadena larga	46907933
PC (20:0/0:0)	[22]		Lisofosfatidilcolina	24779473
PC (20:0/20:4)	[22]	Colina	Fosfatidilcolina	53478881
PC(O-16:0/20:3)	[22]	Colina	Acetilcolina	5353312
p-cimeno	[40]	Degradación de xenobióticos	Monoterpeno	7463
PE (16:0/18:1)	[22]		Fosfatidiletanolamina	5283496
PE(P-18:2/0:0)	[22]		Liso-fosfatidiletanolamina	52925130

Tabla 4. (Continuación)

Metabolito	Referencia	Ruta metabólica	Especie	PubChem CID
Pentano	[27]		Alcano	8003
Piruvato	[32]	Glucólisis	Anión ácido monocarboxílico	107735
PS (12:0/15:1)	[21]	Metabolismo de lípidos	Glicerofosfolípido	52925258
REG1A	[34]		Proteína	160715783
SM (39:1)	[22]		Esfingomielina	134767290
SM (d 18:2/22:0)	[22]		Esfingolípido	52931238
SM (d 18:2/23:0)	[22]		Esfingolípido	52931210
Sulfato de androsterona	[21]	Síntesis de esteroides	Esteroides	159663
Tetradecano	[27]		Alcano	12389
TFF1	[34]		Proteína	160717964
TG (22:2/15:0/18:3)	[21]	Ácidos grasos	Triacilglicérido	131764951
TIMP1 (Inhibidor de metaloproteinasas 1)	[33]		Proteína	381123700
Tirosina	[28,32]	Fenilalanina y tirosina	Aminoácido	6057
Treonina	[28,32]		Aminoácido	6288
Trigonelina	[32,41]		Alcaloide	5570
Trimetilamina N-óxido	[38]	Oxidación trimetilamina	Óxido de amina	1145
Undecano	[27]	Metabolismo carbohidratos	Alcano	14257
Urea	[42]	Metabolismo de aminoácidos	Compuesto nitrogenado	1176
Valina	[32]	Degradación valina	Aminoácido	6287
Xilitol	[28,29,37]	Glucólisis/ Gluconeogénesis	Carbohidrato	6912
α -metilestireno	[30]		Fenilpropeno	7407
γ -Terpineno	[40]	Metabolismo terpenoides	Hidrocarburo insaturado ramificado	7461

Los descubrimientos de biomarcadores mediante resonancia magnética nuclear (NMR) han mostrado prometedores resultados en la identificación de huellas moleculares del cáncer de páncreas. La elevación de los niveles de acetoacetato, leucina, glucosa, componentes acetilados, y la disminución en los niveles de citrato, creatinina, glicina, muestran las diferencias entre pacientes enfermos e individuos sanos ⁴¹.

También se ha observado mediante el uso de esta plataforma, las diferencias en los niveles de metabolitos no solo entre pacientes enfermos y sanos, sino también entre pacientes con enfermedades como la neoplasia pancreática

intraepitelial (PanIN) y pacientes con cáncer de páncreas³². Ambos estudios asocian los compuestos hallados con la ruta de los ácidos tricarboxílicos.

El reconocimiento de enfermedades precursoras del cáncer de páncreas ha generado otras líneas de investigación en donde se intenta relacionar las alteraciones del metaboloma para facilitar la identificación de biomarcadores de cáncer pancreático.

Actualmente se reconocen tres de estas enfermedades como precursoras: la neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN), la neoplasia mucinosa papilar intra ductal (IPMN) y la neoplasia cística mucínica (MCN) ⁴⁷.

En una aproximación para ver los cambios o asociaciones que se dan entre enfermedades, Xianchao y col.³² encontraron diferencias entre los metabolitos debidos a PanIN y entre los debidos al cáncer de páncreas. El número de metabolitos implicados entre estos grupos era significativamente mayor que el observado entre los grupos control y enfermos. Estas diferencias apuntan a la implicación de más rutas metabólicas como el metabolismo de ácidos orgánicos, aminoácidos específicos, transportadores ABC o absorción de minerales ³². Los niveles de lactato y cuerpos cetónicos aumentaron, revelando la mayor actividad de la glucólisis aeróbica y la supresión del ciclo de ácidos tricarboxílicos.

Otra visión muy diferente es la que ofrece Schilling y colaboradores ⁴⁸ usando un análisis de metales. En su estudio encuentran diferencias en las concentraciones de metales esenciales, con disminuciones significativas en los niveles de calcio y magnesio y un aumento en los niveles de cobre y zinc. La disminución de calcio la asocian a la inactivación en la síntesis de proteínas que afectan al flujo de este, como las S100 ⁴⁹. El aumento de las concentraciones de cobre también resultó significativamente discriminatorio entre pacientes con PC e individuos sanos en investigaciones de Lener y col.⁵⁰. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad mostradas por estos posibles marcadores no es suficiente de manera individual (AUC:0.67 para el cobre; 0.68 para zinc y 0.79 para el calcio), pero sí de manera conjunta (AUC de Mg+Ca+Zn+Cu = 0.99). Se necesitan más estudios para poder llegar a confirmar su utilidad.

El enfoque de conseguir la diferenciación, ya no solo entre pacientes enfermos e individuos sanos, sino también entre pacientes con enfermedades pancreáticas no malignas y pacientes con cáncer, marca una importante barrera para evitar tratamientos e intervenciones quirúrgicas innecesarias.

De igual forma el poder obtener metabolitos con capacidad de diferenciación entre enfermedades como el colangiocarcinoma distal (dCCA) y el cáncer de páncreas, como muestra el trabajo de Macias y col. ²², supone un gran avance para poder llevar a cabo los correctos tratamientos. Estos dos tipos de cánceres comparten sintomatología y pueden confundirse empleando técnicas de imagen.

Los metabolitos hallados mayoritariamente son aminoácidos, esfingomielinas y ceramidas. Estos tipos de metabolitos se encuentran también alterados en cáncer de ovario e hígado ⁵¹. Aun así, consiguieron obtener un conjunto de metabolitos con los que obtuvieron resultados de AUC= 0.854, pudiendo diferenciar ambos tipos de cáncer.

3.3 Volatolómica

La volatolómica ha ido ganando peso en los últimos años gracias a los avances en las técnicas analíticas y a las mejoras de los métodos de extracción.

Dicha disciplina, definida como el estudio de los compuestos volátiles que se encuentran en una muestra, consigue identificar una gran cantidad de compuestos de matrices diversas como las mencionadas anteriormente. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se caracterizan por su bajo peso molecular, alta presión de vapor y bajo punto de ebullición. Actualmente hay evidencias de que determinados VOCs, son exclusivos de varios estados de enfermedad es por esto que su potencial como biomarcadores está creciendo ⁵²⁻⁵⁴.

Se han diseñado diferentes modelos para determinar la validez diagnóstica de diversos metabolitos (Tabla 5) con resultados dispares. Estos estudios coinciden en que el uso de un conjunto de metabolitos ofrece valores más fiables que cuando se usan metabolitos de forma aislada.

Tabla 5. Relación de resultados de los modelos diagnósticos elaborados en los estudios de cáncer de páncreas. Los metabolitos marcados (*) han sido identificados sólo en grado de tentativa.

Modelos diagnósticos	AUC	Sensibilidad %	Especificidad %	Referencia
Modelo de validacion cruzada	0,988			[37]
PS(12:0/15:1)*	0,959			[21]
Glutamato+colina+1,5 AG+betina+metilguanidina (grupo de Connecticut)	0,943	97,7	83,1	[34]
Ácido aspártico	0,937	79	96	[22]
Ácido glutámico	0,937	92	88	[22]
LYVE1+REG1A+TFF1	0,926	80	76,9	[33]
PE(16:0/18:1)	0,919	82	88	[22]
SM(d18:2/22:0)	0,919	92	89	[22]
Modelo Y+CA19-9	0,918	81,3	93,8	[29]
SM(39:1)	0,915	88	82	[22]
SM(d18:2/23:0)	0,911	92	87	[22]
ChoE(18:3)	0,907	76	92	[22]
AC(8:0)	0,903	80	92	[22]
TG(22:2/15:0/18:3)*	0,902			[21]
4-oxo-ácido retinoico*	0,900			[21]
SM(38:1)	0,899	96	76	[22]
PE(16:0/0:0)	0,897	79	92	[22]
Modelo Y (Histidina + xilitol)	0,895	75	100	[29]
Modelo X+ CA19-9	0,891	81,3	93,8	[29]
Sulfato de androsterona*	0,878			[21]
LisoPE(18:2)*	0,859			[21]
Fenilalanilfenilalanina*	0,858			[21]

Tabla 5. (Continuación)

Modelos diagnósticos	AUC	Sensibilidad %	Especificidad %	Referencia
1,5 AG+ manosa	0,851	72,7	84,1	[31]
Decaprenil difosfato*	0,850			[21]
Metanoato de butilo*	0,850			[24]
LisoPC(18:2)*	0,848			[21]
DHEA-S*	0,847			[21]
Modelo X (Histidina + inositol + 1,5 AG + xilitol)	0,844	81,3	87,5	[29]
Glutamato+colina+1,5 AG+betina+metilguanidina (grupo de Shanghai)	0,835	77,4	75,8	[34]
CA 19-9	0,832	75	81,3	[29]
1,5 AG	0,813	70,5	72,7	[31]
Manosa	0,781	47,7	86,4	[31]
Xilitol+1,5 AG+ histidina+inositol	0,760	71,4	78,1	[36]
2,4 dimetilhexano*	0,760			[24]
LPC18-0(sn-1)	0,751	40,9	97,7	[31]
Formaldehído+pentano+acetona+isopropil alcohol+n-Hexano+benzaldehído+1-butanol+acetoina+1-metiltio-propano+undecano+tetradecano+hidrato de amileno	0,744	70	74	[27]

Mediante el uso de métodos como la microextracción en fase sólida se consigue una alta concentración de compuestos usando fibras cubiertas con diferentes fases estacionarias que adsorben los analitos. Combinando esta metodología con la cromatografía de gases (GC) y la espectrometría de masas (MS) la cantidad de metabolitos obtenida es enorme.

Además de todo esto una gran ventaja que presenta la GC sobre otras técnicas es su sencillez, bajo coste y que las muestras apenas tienen que ser manipuladas previamente a las mediciones. Prácticamente la única condición que han de presentar las muestras es que contengan compuestos volátiles y que dichos compuestos sean térmicamente estables.

Otro de los aspectos a tener en consideración al tratar los compuestos volátiles es su degradación. Es determinante que se conserven adecuadamente las muestras para evitar la pérdida de componentes.

3.3.1 HS-SPME-GC/MS en la identificación de biomarcadores

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se trata de una de las técnicas más interesantes en la búsqueda de biomarcadores.

Al permitir muestrear matrices de diferente naturaleza se convierte en una técnica versátil y con aplicación en diversos campos.

En lo referente a la identificación de biomarcadores se trata de un campo en desarrollo al igual que otros métodos analíticos. La principal dificultad se encuentra en la enorme cantidad de metabolitos que se pueden encontrar en una muestra unido a la complejidad de las rutas metabólicas que los generan. Para poder aplicar esta técnica con éxito hay que tener presente que los analitos a identificar han de cumplir la característica de ser volátiles y por esto es necesario optimizar las metodologías de extracción para evitar la pérdida de compuestos que puedan ser de interés.

Es necesario a su vez que los procedimientos ofrezcan la mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para conseguir los objetivos propuestos en el campo de la medicina preventiva en particular que es el que se aborda en este trabajo.

3.3.2 Matrices

Hay que tener en cuenta el tipo de matriz sobre la que queremos trabajar. La tendencia actual está en el uso de matrices cuya obtención resulte lo menos invasiva posible para los pacientes. El uso de sangre, suero, orina o aire exhalado es la elección más adecuada.

3.3.2.1 Aire exhalado

Es intuitivo pensar que la matriz idónea para detectar compuestos volátiles sea el aire exhalado.

Diversos estudios relacionados con distintas enfermedades como la tuberculosis, esquizofrenia, enfermedades cardiovasculares, etc., han hecho uso de esta matriz para su detección. Tomó gran relevancia a finales de los 80 al usarse en el diagnóstico de envenenamiento por sustancias volátiles tóxicas ⁵⁵.

De esta forma se han valorado compuestos orgánicos volátiles en la detección del cáncer y usando un conjunto de metabolitos basado en 12 compuestos extraídos del aire exhalado Markar y col. ²⁷ pudieron diferenciar entre pacientes con adenocarcinoma pancreático de individuos sanos con valores de AUC de 0.74.

Los compuestos que presentaron un aumento en sus niveles respecto a los controles pertenecen a cuerpos cetónicos y alcoholes. Así se vieron aumentados los niveles de acetona, acetoína, formaldehído, undecano y alcohol isopropílico. Es común encontrarse este tipo de metabolitos en procesos cancerosos puesto que para cubrir las demandas de energía las células tumorales aumentan la cetogénesis a la vez que activan factores de degradación muscular induciendo a la caquexia ⁵⁶.

Las principales fuentes de energía provienen de la glucosa y de la glutamina y mediante la oxidación de acetilCoA a CO₂ se obtiene ATP. Una de las irregularidades que se producen es la salida de metabolitos desde el ciclo de los ácidos tricarbónicos, derivándose a rutas biosintéticas de ácidos grasos y aminoácidos no esenciales ⁵⁸.

Compuestos como el 1,5-anhidro-D-glucitol (1,5-AG)^{28,29,35,37}, histidina²⁸, colina^{35,42} o tirosina²⁹ son recurrentes en diversos trabajos, usándose por tanto en estudios diagnósticos para comprobar la sensibilidad y selectividad de los mismos.

El modelo diagnóstico diseñado por Kobayashi y col. ³⁷ resulta prometedor contando con los metabolitos xilitol, 1,5-AG, histidina e inositol, como variables. Su modelo consiguió valores de AUC de 0.76 con una sensibilidad del 71.4% y una especificidad de 78.1%, contando así con una mayor precisión respecto a los clásicos marcadores CA 19-9 y CEA. Por su parte el trabajo realizado por Guoxiang y col.³⁵, donde combinan cromatografía líquida y gases, y las muestras provienen de dos grupos poblacionales diferentes, ofrece valores de AUC de 0.94 con una sensibilidad de 97.7% y una especificidad del 83.1%, en la población de Connecticut, y valores de 0.83 de AUC con un 77.4% de sensibilidad y 75.8% de especificidad en la población de Shanghai. Resulta de gran interés este trabajo al combinar dos plataformas y dos grupos poblacionales diferentes.

Compuestos como el 1,5 anhidro-D-glucitol se relacionan con el control de glucemia en sangre y por tanto sus niveles no sólo se encuentran alterados en patologías como el cáncer de páncreas, como indican los trabajos de Guonxiang y col.³⁵ o Kobayashi y col.³⁷, sino también en enfermedades como la diabetes ⁵⁹.

La disminución en los niveles de histidina también se ha detectado en enfermedades como artritis, fallo renal crónico u obesidad⁶⁰. Referente al páncreas, la histidina es precursora de la histamina la cual actúa sobre las células cancerosas inhibiendo su desarrollo. La enzima que cataliza esta reacción, la histidina decarboxilasa, se encuentra en diferentes tipos celulares cuando el páncreas se ve afectado por el crecimiento tumoral ⁶¹, mientras que sólo se localiza en células de glucagón cuando el órgano está sano.

Más estudios de Kobayashi y col. ²⁸ habían determinado una asociación entre los niveles crecientes de metionina y decrecientes de 1,5 anhidro-D-glucitol con el desarrollo del cáncer de páncreas. Sin embargo, ellos mismos concluyeron que, tras introducir como variables factores como el tabaquismo, antecedentes de diabetes o el índice de masa corporal, los metabolitos no mostraban diferencias especialmente significativas entre unos grupos y otros.

Más actual es el estudio de metabolómica dirigida, también de Kobayashi y col.²⁹, donde basándose en los resultados de sus trabajos anteriores diseñan dos modelos de conjuntos de metabolitos (modelo X: Histidina+inositol+1,5 AG+xilitol y modelo Y: Histidina+xilitol). Los valores de AUC para el conjunto 1 fueron de 0.86

y 0.83 para el modelo X e Y, respectivamente; mientras que los valores en el conjunto 2 fueron 0.84 para X y 0.89 para Y. Con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad diseñaron otro modelo adicional (Y + CA 19-9) obteniendo un AUC de 0.93 para el conjunto 1 y 0.91 para el conjunto 2. El interés de este estudio reside en la elaboración de los modelos en dos conjuntos con matrices diferentes. En el conjunto 1 utilizan suero mientras que el conjunto 2 está diseñado usando plasma, cuyo único tratamiento es la adición de anticoagulante.

En la búsqueda de diferencias significativas para procesos tumorales similares, trabajos como el de Macias y col.²² construyen un perfil de metabolitos capaz de distinguir entre pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pancreático ductal (PDCA) y pacientes con colangiocarcinoma distal (dCCA). En su estudio, los metabolitos seleccionados no presentan suficiente capacidad discriminadora de manera individual, sin embargo, cuando se combinan el modelo ofrece resultados más prometedores. El área bajo la curva en la etapa de validación es de 0.826 con una sensibilidad del 60% y una especificidad del 88.9%.

Dentro de la misma enfermedad Nishiumi y col.⁴² observaron variaciones de ácido L-glutámico en función del estado de desarrollo de la misma. La etapa IV puede subdividirse en IVa y IVb, registraron una variación gradual en los niveles de este metabolito. Así, la etapa IVb presentaba los niveles más altos, disminuyendo a lo largo de las demás etapas hasta los voluntarios sanos que tenían los niveles más bajos.

Esto es un reflejo del gran potencial de la metabolómica para detectar variaciones en las concentraciones de metabolitos en diferentes etapas del organismo. Esto posibilita no sólo poder detectar una enfermedad, sino también realizar un seguimiento de la misma a lo largo del tiempo o estudiar el efecto que provoca un medicamento o tratamiento.

3.3.2.3 Orina

La sencillez de la recogida de muestras de orina convierte a esta matriz en la candidata perfecta para fines clínicos. Para su obtención no hace falta emplear métodos invasivos y, además, se consigue un volumen más que suficiente del cual se pueden realizar alícuotas.

Estudios de evaluación y optimización de los parámetros que afectan a la concentración de metabolitos en una muestra han demostrado que, mientras no se superen dos ciclos de congelación/descongelación, los metabolitos pueden conservarse sin alteraciones a una temperatura de -80°C hasta seis meses⁶².

Las muestras apenas necesitan tratamiento previo. Estudios de optimización de la extracción han resuelto las condiciones óptimas mediante la modificación de la fibra, temperatura de extracción y pH. Así, Monteiro y colaboradores³⁶ determinaron que en un entorno ácido (pH =2), con una fibra tipo DVB/PDMS (Divinilbenzeno/Polidimetilxilosano) y adicionando 0.59 g de NaCl, tras incubar la

muestra durante 9 minutos con una temperatura de extracción de 68°C durante 24 minutos, se obtenían los mejores resultados con una mayor cantidad de analitos.

Por su parte Živković y col.⁶² realizaron sendos trabajos de optimización concluyendo que a 60°C se obtenían los mejores valores, aunque el trabajo de García Casado⁶³ revela que la mejor temperatura es 50°C. La temperatura de extracción es un factor que puede modificarse en función de los compuestos que más nos interesen, así, aquellos compuestos más volátiles necesitarán de temperatura menores, mientras que los menos volátiles se extraerán a temperaturas más elevadas.

Las fibras se seleccionan en función de las propiedades, polaridad y volatilidad de los analitos que se quieran extraer de la muestra. En la técnica de HS-SPME es común la adición de sal a la muestra pues mejora la transferencia de los analitos al espacio de cabeza (efecto salting-out)⁶⁴.

La necesidad de realizar estas optimizaciones se debe a la existencia de compuestos conjugados que no se ven reflejados debido a su mayor peso molecular y su naturaleza hidrofílica, reduciendo su volatilidad⁶⁵. Mediante la acidificación del medio se ha demostrado el aumento del número de compuestos volátiles al pasar a su estado no conjugado³⁶. Asimismo, el trabajo realizado por Wagens-tallerel y Buettner⁶⁶ tratando enzimáticamente las muestras con β - glucuronidasa consiguió la separación del doble de compuestos respecto a las muestras no tratadas.

Los compuestos orgánicos volátiles se pueden clasificar en base a su funcionalidad química en diversos grupos como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y compuestos aromáticos⁶⁷.

Gran parte de los metabolitos encontrados en orina pertenecen a estos grupos y muestran alteraciones en sus niveles debidas a estados cancerosos. Así se ve en reflejado en el estudio de Monteiro y colaboradores³⁰ con un incremento de 2- oxopropanal y 2,8-trimetil-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol. Lo mismo sucede con la hipoxantina, trimetilamina o acetilcarnitina³⁸, compuestos derivados de aminoácidos que presentan variaciones en pacientes con cáncer.

Estos metabolitos suelen generarse en rutas como la degradación de aminoácidos o la glucólisis. Esta ruta suele tener un menor rendimiento energético, siendo más eficiente la fosforilación oxidativa, pero se trata de un camino más rápido en la obtención de energía⁶⁸, condición necesaria en tejidos cancerosos con crecimiento descontrolado, es el denominado efecto Warburg.

4 CONCLUSIONES

Los trastornos celulares originados por el cáncer de páncreas se relacionan con multitud de factores.

A la hora de identificar biomarcadores para esta enfermedad es necesario tener en cuenta tanto los factores hereditarios como los factores externos, los cuales han demostrado que tienen gran influencia en la huella metabólica.

Actualmente los principales problemas observados en la identificación de biomarcadores provienen de la complejidad de las rutas metabólicas y de la falta de sensibilidad y especificidad de los modelos creados, esto puede ser debido a que la fracción de población tomada para los estudios suele ser pequeña y por lo tanto no es suficientemente representativa.

El camino a seguir pasa por usar matrices de recogida de muestras lo menos invasivas posible y que además sean capaces de proporcionar información suficiente para distinguir no sólo pacientes enfermos de sanos sino también entre distintas enfermedades y distintos estadios de una misma enfermedad. La tendencia en este sentido es lo que se refleja en los estudios más actuales.

El uso de multiplataformas para recoger datos metabólicos mejora los resultados de los modelos estadísticos elaborados, ya que no hay una única con capacidad para detectar todos los metabolitos de una muestra biológica. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se trata de una de estas plataformas dado que la detección de VOCs es una manera eficaz para discriminar entre diferentes grupos. Además, en base a los estudios analizados los VOCs como biomarcadores se sitúan en un buen lugar debido a que se pueden detectar a partir de una matriz como la orina, la cual es la mejor elección al obtenerse de manera no invasiva.

Se hace necesario la optimización de los métodos de extracción de los metabolitos para asegurar la reproducibilidad y evitar la variabilidad, mejorando de este modo la fiabilidad de las pruebas diagnósticas.

Finalmente, no hay que olvidar la importancia de la identificación correcta de los metabolitos y su almacenamiento en bases de datos. El poder dar el paso de una identificación en grado de tentativa a una identificación confirmada puede marcar la diferencia entre diagnósticos con las implicaciones que eso conlleva.

5 AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis tutoras, Teresa y Pilar, el apoyo y confianza prestados durante el desarrollo del trabajo. Gracias a sus consejos y guía ha sido posible sacarlo adelante después de tanta incertidumbre.

Gracias a mis amigos que, desde la distancia, me han ayudado a evadirme de una manera, como siempre, incondicional.

Y siempre gracias a mi familia, que son los que más aguantan, especialmente a mi madre que, con paciencia infinita, siempre me da su apoyo y me pone la mejor cara.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. ¿Qué es el Cáncer de Páncreas? | AECC. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pancreas>.
2. De La Cruz MS, Young AP RM. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *American Family Physician*. 2014;89(8):626-632.
3. López Serrano A. Factores de riesgo y diagnóstico temprano del cáncer de páncreas. *Gastroenterología y Hepatología*. 2010;33(5):382-390.
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020. *Sociedad Española de Oncología Médica*. 2020:36.
5. Red Española de Registros de Cáncer. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2019. *Red Española de Registros de Cáncer*. 2019:1-20.
6. Red Española de Registros de Cáncer. Supervivencia de cáncer en España, 2002-2013. *Red Española de Registros de Cáncer*. 2020:1-82.
7. Vailati-Riboni M., Palombo V. LJJ. What Are Omics Sciences? (Ametaj BN, ed.). Cham: Springer International Publishing; 2017.
8. Mallard PJL and WG. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.
9. Data Sources PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/sources/>. Accessed July 6, 2020.
10. ChemSpider | Search and share chemistry. <http://www.chemspider.com/>. Accessed July 6, 2020.
11. Carneiro G, Radcenco AL, Evaristo J, Monnerat G. Novel strategies for clinical investigation and biomarker discovery: A guide to applied metabolomics. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2019:1-13.
12. Maurel J, Pineda E. Biomarcadores en los tumores digestivos. In: *Tests de Laboratorio En Gastroenterología Y Hepatología*. Vol 10. ; 2016:176.
13. Yu A, Romero TA, Genkinger JM. Primary and secondary prevention of pancreatic cancer. *Current Epidemiology Reports*. 2019;6(2):119-137.
14. Sparkman OD, Penton ZE, Kitson FG. Gas chromatography. In: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier; 2011:15-83.
15. Wettersten HI, Weiss RH. Applications of metabolomics for kidney disease research. *Organogenesis*. 2013;9(1):11-18.
16. Di Gangi IM, Vrhovsek U, Pazienza V, Mattivi F. Analytical metabolomics-

- based approaches to pancreatic cancer. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014;55:94-116. doi:10.1016/j.trac.2013.12.006
17. Schantz MM, Benner BA, Heckert NA, et al. Development of urine standard reference materials for metabolites of organic chemicals including polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates, phenols, parabens, and volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(11):2945-2954. doi:10.1007/s00216-014-8441-0
 18. Royo Bordonada MÁ, Damián Moreno J. Método epidemiológico. *Escuela Nacional de Sanidad (ENS) Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Ciencia e Innovación*. 2009:219.
 19. Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances en Biomedicina*. 2012;1(2):73-81.
 20. Hayden SR, Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Annals of Emergency Medicine*. 1999;33(5):575-580.
 21. Martín-Blázquez A, Jiménez-Luna C, Díaz C, et al. Discovery of pancreatic adenocarcinoma biomarkers by untargeted metabolomics. *Cancers*. 2020;12(4):1002.
 22. Macias RIR, Muñoz-Bellvís L, Sánchez-Martín A, et al. A novel serum metabolomic profile for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers*. 2020;12(6):1433.
 23. Nissinen S, Roine A, Hokkinen L, et al. Detection of pancreatic cancer by urine volatile organic compound analysis. *Anticancer Research*. 2019;39(1):73-79.
 24. Hontañón A, Tena MT, Carnicero AM, et al. Searching for predictive biomarkers of pancreatic cancer in serum volatolome. A preliminary study. *Actualidad Analítica*. 2019;67:20-23.
 25. Fest J, Vijfhuizen LS, Goeman JJ, et al. Search for early pancreatic cancer blood biomarkers in five european prospective population biobanks using metabolomics. *Endocrinology*. 2019;160(7):1731-1742.
 26. Woollam M, Teli M, Angarita-Rivera P, et al. Detection of volatile organic compounds (VOCs) in urine via gas chromatography-mass spectrometry QTOF to differentiate between localized and metastatic models of breast cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):2526.
 27. Markar SR, Brodie B, Chin S-T, Romano A, Spalding D, Hanna GB. Profile of exhaled-breath volatile organic compounds to diagnose pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*. 2018;105(11):1493-1500.
 28. Nakagawa T, Kobayashi T, Nishiumi S, et al. Metabolome analysis for pancreatic cancer risk in nested case-control study: Japan public health center-based prospective study. *Cancer Science*. 2018;109(5):1672-1681.

29. Hirata Y, Kobayashi T, Nishiumi S, et al. Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. *Clinica Chimica Acta*. 2017;468:98-104.
30. Monteiro M, Moreira N, Pinto J, et al. GC-MS metabolomics based approach for the identification of a potential VOC biomarker panel in the urine of renal cell carcinoma patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(9):2092-2105.
31. Sakai A, Suzuki M, Kobayashi T, et al. Pancreatic cancer screening using a multiplatform human serum metabolomics system. *Biomarkers in medicine*. 2016;10(6):577-586.
32. Lin X, Zhan B, Wen S, Li Z, Huang H, Feng J. Metabonomic alterations from pancreatic intraepithelial neoplasia to pancreatic ductal adenocarcinoma facilitate the identification of biomarkers in serum for early diagnosis of pancreatic cancer. *Molecular BioSystems*. 2016;12(9):2883-2892.
33. Capello M, Bantis LE, Scelo G, et al. Sequential validation of blood based protein biomarker candidates for early stage pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2017;109(4):djw266.
34. Radon TP, Massat NJ, Jones R, et al. Identification of a three-biomarker panel in urine for early detection of pancreatic adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(15):3512-3521.
35. Xie G, Lu L, Qiu Y, et al. Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(2):1195-1202.
36. Monteiro M, Carvalho M, Henrique R, et al. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: Application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2014.
37. Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, et al. A novel serum metabolomics based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2013;22(4):571-579.
38. Davis VW, Schiller DE, Eurich D, Bathe OF, Sawyer MB. Pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a distinct urinary metabolomic signature. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20(S3):415-423.
39. Silva CL, Passos M, Câmara JS. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers—A powerful strategy for breast cancer diagnosis. *Talanta*. 2012;89:360-368.
40. Silva CL, Passos M, Câmara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *British*

Journal of Cancer. 2011;105(12):1894-1904.

41. Napoli C, Sperandio N, Lawlor RT, Scarpa A, Molinari H, Assfalg M. Urine metabolic signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by ¹H nuclear magnetic resonance: Identification, mapping, and evolution. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(2):1274-1283.
42. Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010;6(4):518-528.
43. Llop E, Guerrero PE, Duran A, et al. Glycoprotein biomarkers for the detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(24):2537-2554.
44. Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2004;19(2):182-186.
45. Boyle KA, James MA, Tsai S, Evans DB, Dwinell MB. Stromal inflammation in pancreatic cancer: mechanisms and translational applications. In: *Pancreatic Cancer*. New York, NY: Springer New York; 2018:481-508.
46. Pérez-Mancera PA. Mouse models of pancreatic exocrine cancer. In: Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese JL, Büchler MW, eds. *Pancreatic Cancer*. New York, NY: Springer New York; 2018:509-538.
47. I Vaccaro M, Resnik R. Translational pancreatology. New approaches in the development of novel biomarkers as screening methodologies for pancreatic cancer. *Journal of Translational Gastroenterology and Clinical Hepatology*. 2018;1(1):101.
48. Schilling K, Lerner F, Saad A, et al. Urine metallomics signature as an indicator of pancreatic cancer. *Metallomics*. 2020;12(5):752-757.
49. Leclerc E, Vetter SW. The role of S100 proteins and their receptor RAGE in pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(12):2706-2711.
50. Lener MR, Scott RJ, Wiechowska-Kozłowska A, et al. Serum concentrations of selenium and copper in patients diagnosed with pancreatic cancer. *Cancer Research and Treatment*. 2016;48(3):1056-1064.
51. Simon J, Ouro A, Ala-Ibanibo L, Presa N, Delgado TC, Martínez-Chantar ML. Sphingolipids in non alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: ceramide turnover. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;21(1):40.
52. Hong-Geller E, Adikari S. Volatile organic compound and metabolite signatures as pathogen identifiers and biomarkers of infectious disease. In: *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*. Vol i. InTech; 2018:13.

53. Navaneethan U, Parsi MA, Gutierrez NG, et al. Volatile organic compounds in bile can diagnose malignant biliary strictures in the setting of pancreatic cancer: a preliminary observation. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2014;80(6):1038-1045.
54. Schmidt K, Podmore I. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *Journal of Biomarkers*. 2015;2015:1-16.
55. Princivale A, Monasta L, Butturini G, Bassi C, Perbellini L. Pancreatic ductal adenocarcinoma can be detected by analysis of volatile organic compounds (VOCs) in alveolar air. *BMC Cancer*. 2018;18(1):529.
56. Shukla SK, Gebregiorgis T, Purohit V, et al. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer & Metabolism*. 2014;2(1):18.
57. Goodwin M, Abel E V, Purohit V, Simeone DM. Pancreatic Cancer Stem Cells. In: Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese JL, Büchler MW, eds. *Pancreatic Cancer*. New York, NY: Springer New York; 2018:349-368.
58. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013;496(7443):101-105.
59. Dungan KM, Buse JB, Largay J, et al. 1,5-Anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by continuous glucose monitoring system in moderately controlled patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1214-1219.
60. Holeček M. Histidine in Health and Disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients*. 2020;12(3):848.
61. Francis T, Graf A, Hodges K, et al. Histamine regulation of pancreatitis and pancreatic cancer: a review of recent findings. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2013;2(4):216-21626.
62. Živković Semren T, Brčić Karačonji I, Safner T, Brajenović N, Tariba Lovaković B, Pizent A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions. *Talanta*. 2018;176(August 2017):537-543.
63. Casado CG. Estudio volatolómico preliminar para la identificación de biomarcadores en cáncer de páncreas. *Trabajo de fin de grado. Universidad de La Rioja*. 2018.
64. Kudlejova L, Risticvic S, Vuckovic D. Solid phase microextraction method development. In: *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier; 2012:201-249.
65. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*. 2010;154(2):103-116.

66. Wagenstaller M, Buettner A. Characterization of odorants in human urine using a combined chemo-analytical and human-sensory approach: a potential diagnostic strategy. *Metabolomics*. 2013;9(1):9-20.
67. Janfaza S, Khorsand B, Nikkhah M, Zahiri J. Digging deeper into volatile organic compounds associated with cancer. *Biology Methods and Protocols*. 2019;4(1):1-11.
68. Bathe OF. Characterizing the metabolomic effects of pancreatic cancer. In: *Molecular Diagnostics and Treatment of Pancreatic Cancer*. Elsevier; 2014:323-343.
69. Blum R, Kloog Y. Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death & Disease*. 2014;5(2):e1065-e1065.